

EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN GEDI MERAH (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) TERHADAP KADAR TNF-ALFA JANTUNG DAN NEKROSIS KARDIOMIOSIT TIKUS MODEL DIABETES MELITUS TIPE 2

Afifah Sakinah, Sasi Purwanti, Yudi Purnomo*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

*Corresponding author email : yudi.purnomo@unisma.ac.id

MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144 Tel. (0341) 558959

ABSTRAK

Pendahuluan: Hiperglikemia kronis menyebabkan peningkatan risiko komplikasi kardiomiopati diabetik. Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) dikenal memiliki potensi antidiabetik, namun penelitian tentang efek daun gedi merah terhadap komplikasi kardiomiopati diabetik belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun gedi merah terhadap kadar TNF- α jaringan jantung dan jumlah nekrosis kardiomiosit pada tikus Diabetes Mellitus (DM) tipe 2.

Metode: Tikus *sprague dawley* jantan usia 4-6 minggu dikelompokkan menjadi kelompok normal (KN), kelompok diabetes melitus (KDM) dan kelompok ekstrak daun gedi merah (EDGM) dosis I (200 mg/kgBB), II (400 mg/kgBB), dan III (800 mg/kgBB) (n=5 ekor). Tikus diinduksi DTLF dan STZ 25 mg/kgBB i.p *multiple dose*. EDGM diberikan selama 4 minggu per oral. Kadar TNF- α diukur dengan *microplate reader* $\lambda = 450$ nm, sedangkan jumlah nekrosis kardiomiosit dengan pengecatan *Hematoxylin Eosin* diamati menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 400x. Analisa statistik menggunakan One Way ANOVA dilanjutkan dengan uji BNT ($p < 0,05$).

Hasil: Pemberian EDGM dengan dosis I, II, dan III secara signifikan menurunkan kadar TNF- α jantung berturut-turut sekitar 50%, 30%, dan 40% dibandingkan kelompok KDM ($p < 0,05$), sedangkan jumlah nekrosis kardiomiosit menurun sekitar 40%, 20%, dan 30% ($p < 0,05$). Pada kelompok KDM, kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomiosit mengalami peningkatan dibandingkan kelompok KN ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Pemberian EDGM dapat menghambat peningkatan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomiosit pada tikus DM tipe 2 dengan efek terkuat pada dosis 200 mg/kgBB.

Kata Kunci : Gedi merah, DTLF, STZ, diabetes, TNF- α , nekrosis kardiomiosit.

EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF *Abelmoschus manihot* ON TNF-ALFA HEART LEVELS AND TOTAL OF CARDIOMYOCYTE NECROSIS IN DIABETES MELLITUS RATS

ABSTRACT

Introduction : Chronic hyperglycaemia causes an increased risk on complication of cardiomyopathy diabetetic. *Abelmoschus manihot* are known to has potential of antidiabetic, but research about the effects of red gedi on complication of cardiomyopathy diabetetic has not been studied. This research aims to determine the effects of ethanol extract red gedi leaves on heart TNF- α levels and number of cardiomyocytes necrosis in type 2 diabetic mellitus rats.

Methods : This study used 4-6-weeks-old *Sprague dawley* male rats which grouped into normal group (NG), diabetes mellitus group (DMG), and ethanol extract of red gedi leaves with doses I (200 mg/kgBW), II (400 mg/kgBW), and III (800 mg/kgBW) (n = 5 rats). The rats were induced by High-Fat-Fructose-Diet (HFFD) and 25 mg/kgBW of Streptozotocin (STZ) injection intraperitoneally. The rats were administrated with ethanol extract of red gedi leaves for 4 weeks per-oral. Heart TNF- α levels were measured using microplate reader $\lambda = 450$ nm, while the number necrosis of cardiomyocytes were observed by HE staining using a trinocular microscope at 400x magnification. Data were analyzed with one way ANOVA and continued by LSD test ($p < 0.05$).

Results : Ethanol extract of red gedi leaves dose I, II, and III can decrease heart TNF- α level approximately 50%, 30%, and 40% compared to diabetic group ($p < 0,05$), while the number of cardiomyocyte necrosis decrease approximately 40%, 20%, and 30% ($p < 0,05$). In diabetic group, heart TNF- α level and the number of cardiomyocyte necrosis were increased compared to normal group ($p < 0,05$).

Conclusion : Ethanol extract of red gedi leaves can inhibit the increase of cardiac TNF- α levels dan the number of cardiomyocyte necrosis in diabetic rats with the most effective effect at the dose of 200 mg/kgBW.

Keywords : Red gedi, HFFD, STZ, diabetes, TNF- α , cardiomyocyte necrosis

PENDAHULUAN

Komplikasi kardiomiopati pada DM juga masih menjadi permasalahan di dunia. Kardiomiopati diabetik merupakan komplikasi diabetes mellitus yang ditandai dengan adanya perubahan struktur dan fungsi pada miokardium tanpa adanya faktor risiko seperti *coronary artery disease*, hipertensi, dan *valvular disease*¹. Pasien diabetes mellitus yang mengalami komplikasi kardiomiopati kurang lebih 12% dan meningkat sekitar 22% pada pasien yang berusia lebih dari 64 tahun².

Komplikasi kardiomiopati diabetik disebabkan oleh kondisi stres oksidatif. Hiperglikemi pada DM menimbulkan peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui jalur *polyol pathway*, *advanced glycation end products* (AGEs), aktivasi isoform protein kinase c dan *hexosamine pathway*³. Ketidakseimbangan antara peningkatan ROS dengan ketersediaan antioksidan menimbulkan kondisi stres oksidatif dan kerusakan jaringan⁴. Kerusakan oksidatif jaringan menimbulkan reaksi inflamasi melalui over stimulasi *Nuclear Factor kappa Beta* (NF- κ B) sehingga meningkatkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α ⁵. TNF- α adalah salah satu sitokin pleiotropik yang berpotensi dalam aktivasi sel *polymorphonuclear* (PMN) serta berperan dalam apoptosis sel, remodeling vaskular, dan menurunkan produksi *nitric oxide* (NO)^{6,7}. Ikatan TNF- α dengan reseptornya yaitu TNFR1 menimbulkan proses nekrosis pada kardiomiopati sehingga menimbulkan disfungsi organ jantung^{8,9}.

Daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) merupakan tanaman yang memiliki khasiat obat. Berdasarkan data empiris, tanaman daun gedi merah sering digunakan masyarakat sebagai pengobatan alternatif untuk kencing manis, radang, dan hipertensi¹⁰. Hasil uji preklinik menunjukkan efek anti diabetes pada daun gedi merah terjadi melalui penghambatan enzim α glukosidase yang diprediksi diperankan oleh senyawa flavonoid¹¹. Senyawa flavonoid juga berperan sebagai anti DM melalui regenerasi kerusakan yang terjadi pada sel beta pankreas¹¹. Studi lain menunjukkan gedi merah juga mengandung senyawa tanin yang berperan untuk mengurangi penyerapan glukosa dengan mengerutkan epitel usus halus, sedangkan senyawa alkaloid berperan dalam merangsang sintesis glikogen dan menghambat sintesis glukosa^{12,13}. Hingga saat ini penelitian tentang efek ekstrak etanol daun gedi merah terhadap komplikasi kardiomiopati diabetik belum dilakukan.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium secara *in vivo* dengan desain *control group post test only*. Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik Universitas Brawijaya Malang dengan sertifikat etik No. 028-KEP-UB tahun 2020. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya (FK UB), Laboratorium Patologi Anatomi FK UB, Laboratorium Farmakologi FK UB, dan Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA).

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus galur *sparague dawley*. Usia tikus 4-6 minggu dengan berat badan sekitar 180-200 gram. Tikus dibagi menjadi 2 kelompok kontrol yang terdiri dari kelompok normal dan kelompok diabetes melitus, serta 3 kelompok perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (EDGM).

Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Pembuatan tikus model DM menggunakan induksi diet tinggi lemak fruktosa (DTLF) dan induksi streptozotocin (STZ). DTLF terdiri dari kuning telur (4%), minyak kambing (6,5%), minyak babi (6,5%), asam kolat (0,2%), pakan ayam (82,8%), dan air secukupnya yang diberikan 25 gram/hari setiap sore selama 6 minggu¹⁴. Pemberian fruktosa 20% terdiri dari 200 ml fruktosa dicampur kedalam 1000 ml air yang diberikan 40ml/hari *ad libitum*. Induksi STZ dilakukan setelah memasuki minggu ke-4 pemberian DTLF, dengan dosis STZ sebanyak 25 mg/kgBB secara intraperitoneal *multiple dose*. Pengukuran kadar gula darah puasa dilakukan 72 jam pasca injeksi¹⁵. Tikus dinyatakan DM apabila kadar glukosa ≥ 126 mg/dl¹⁶.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah

Serbuk daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) diperoleh dari Balai Materia Medika, Batu, Jawa Timur, dengan surat keterangan determinasi nomer 074/193A /102.7/2020. Dosis ekstrak etanol daun gedi merah yang digunakan adalah 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB¹². Ekstraksi daun gedi merah menggunakan metode soxhletasi. Serbuk daun gedi merah ditimbang sebanyak 25 gram dalam 250 ml etanol 96%. Setelah itu, dilakukan pemanasan pada pelarut sesuai titik didih dan ekstraksi dihentikan apabila pelarut berwarna jernih. Hasil ekstrak dihilangkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan bentuk pasta. Ekstrak disuspensi dengan CMC-Na 0,1% sebelum disondekan dalam tiga dosis⁵².

Pembedahan dan Pengambilan Sampel Hewan Coba

Hewan coba dikorbankan dengan pemberian injeksi ketamin 0,2 ml intramuskular. Kemudian tikus dibedah secara vertikal mengikuti linea media dari arah abdomen menuju thorax hingga seluruh abdomen dan thorax terbuka. Kemudian dilakukan pengambilan organ jantung lalu dibilas dengan larutan fisiologis *Sodium Chloride* (NaCl) sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Organ jantung yang akan diamati disimpan di tempat penyimpanan.

Pengukuran kadar TNF- α jaringan

100 μ l Standart Working Solution ditambahkan pada well di 2 kolom pertama. Kemudian 100 μ l supernatan ditambahkan pada well yang tersisa kemudian diinkubasi pada 37°C selama 90 menit. Setelah itu 100 μ l *Biotinylated Detection Ab working solution* ditambahkan pada setiap well dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Aspirasi dan cuci menggunakan 350 μ l *Wash buffer* dan ditambahkan 100 μ l HRP Conjugate untuk masing-masing well. Kemudian well diinkubasi pada 37°C selama 30 menit. Lakukan aspirasi dan cuci menggunakan 350 μ l *Wash buffer* kemudian tambahkan 90 μ l substrat reagent pada ruangan yang gelap. Kemudian well diinkubasi pada 37°C selama 15 menit lalu 50 μ l *stop solution* ditambahkan pada well dan tentukan nilai OD pada panjang gelombang 450 nm dan hasil dinyatakan dalam satuan pg/mL⁴⁵.

Pengukuran Jumlah Nekrosis Kardiomiosit

Organ jantung bagian ventrikel dimasukan ke botol flakon kemudian direndam kedalam larutan fiksatif formalin 10 %. Jantung dipotong (*trimming*) kurang lebih 2-3 mm dan diproses dengan alat *automatic tissue texture processor* selama 90 menit

dengan teknik *dehydration* untuk mengeluarkan cairan dalam jaringan agar dapat diisi dengan parafin. Selanjutnya dilakukan *clearing* dengan xylol dilanjutkan dengan *infiltration* dengan parafin, kemudian jaringan diangkat dari mesin *tissue processor* dan dilakukan blok parafin. Blok parafin jaringan dipotong dengan alat microtome ketebalan 3-5 mikron dan dilakukan proses pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE) dilanjutkan pengamatan menggunakan mikroskop trinokuler perbesaran 400x. Kemudian dihitung jumlah kardiomiosit yang mengalami piknotik, karioreksis dan kariolisis pada 10 lapang pandang (LP) untuk setiap preparat dan diambil rataannya³⁹.

Analisa Statistik

Data yang diperoleh dianalisa dengan uji normalitas dan homogenitas. Apabila data dinyatakan terdistribusi normal maka dilakukan uji beda menggunakan metode statistik parametrik yaitu *one way ANOVA* dan dilanjutkan uji *least significance different* (LSD). Hasil dinyatakan bermakna apabila nilai $p < 0,05$. Analisa data dilakukan menggunakan software statistik SPSS.

HASIL DAN ANALISA DATA

Karakteristik Sampel

Pada penelitian ini didapatkan hasil karakteristik hewan coba yang tercantum dalam **tabel 1**.

Tabel 1. Karakteristik sampel

n=5	KN	KDM	EDGM 200 mg/KGBB	EDGM 400 mg/KGBB	EDGM 800 mg/KGBB
BB pra perlakuan (g)	242.8 \pm 12.7 ^a	230.4 \pm 11.5 ^a	246.8 \pm 18.9 ^a	256.2 \pm 32.20 ^a	253.0 \pm 25.08 ^a
BB pasca perlakuan (g)	335.4 \pm 34.9 ^a	279.2 \pm 54.0 ^b	304.80 \pm 52.0 ^c	324.8 \pm 24.1 ^c	333.6 \pm 29.8 ^a
Δ BB (g)	92,6 \pm 27,6	48,8 \pm 44,5	58.0 \pm 48,9	68,6 \pm 33,2	80,6 \pm 10,7
Asupan Pakan (%)	89.6 \pm 9.6 ^a	84,8 \pm 7,7 ^a	77,6 \pm 15,1 ^a	86,4 \pm 9,21 ^a	81,6 \pm 12,2 ^a
KGDP awal (mg/dL)	74.6 \pm 3.0 ^a	85.0 \pm 8.5 ^b	83.2 \pm 5.3 ^b	87.6 \pm 3.9 ^b	81.6 \pm 3.2 ^b
KGDP pra perlakuan (mg/dL)	100.0 \pm 7.9 ^a	182.6 \pm 43.1 ^b	171.6 \pm 11.6 ^b	172.2 \pm 26.6 ^b	163.6 \pm 9.9 ^b
KGDP pasca perlakuan (mg/dL)	111.6 \pm 5.9 ^a	149.8 \pm 11.1 ^b	130.6 \pm 4.8 ^c	120.8 \pm 11.4 ^d	113.8 \pm 5.7 ^a
Δ KGDP (mg/dL)	11.6 \pm 13.7	32.8 \pm 34.3	41.0 \pm 9.7	51.4 \pm 33.0	49.8 \pm 6.2

Keterangan:

Data tabel 1 merupakan data kelompok

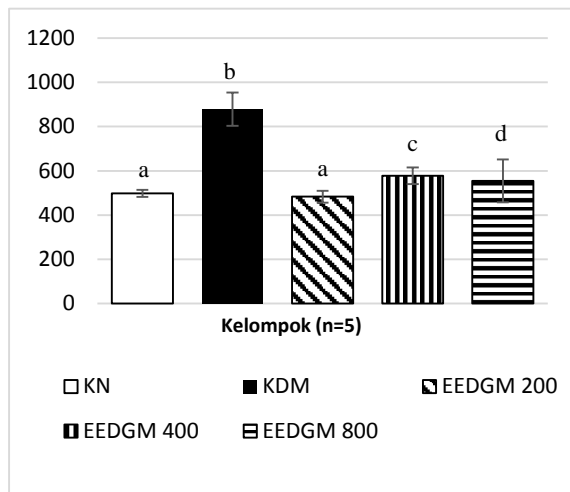
Data dalam mean \pm SD. Uji statistik menggunakan *One Way Anova* dan *Post Hoc LSD test*, BB: Berat Badan, Δ BB: selisih BB post treat dan pre treat, KGDP : Kadar Glukosa Darah Puasa, Δ KGDP : selisih KGDP post treat dan pre treat, KN: Kontrol Normal, KDM: Kontrol Diabetes Melitus, EDGM: pemberian ekstrak daun gedi merah. Notasi yang berbeda menunjukkan signifikansi ($p < 0.05$). BB pra perlakuan: sebelum induksi DM, BB pasca perlakuan: setelah induksi DM dan EDGM KGDP Awal: sebelum induksi DM dan EDGM, KGDP pra perlakuan: setelah induksi STZ, KGDP pasca perlakuan: setelah diberi EDGM.

Berdasarkan tabel 1, berat badan pra perlakuan relatif tidak berbeda antar kelompok ($p > 0,05$). Berat badan pasca perlakuan cenderung lebih meningkat pada kelompok Ekstrak Daun Gedi Merah (EDGM) dibandingkan KDM ($p < 0,05$). Berat badan pasca perlakuan pada kelompok KDM cenderung lebih rendah dibandingkan KN ($p < 0,05$).

Asupan pakan pada kelompok KDM cenderung menurun dibandingkan kelompok KN tetapi tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Kadar Gula Darah Puasa pra perlakuan cenderung meningkat pada kelompok DM dan perlakuan setelah induksi DM dibandingkan KN ($p > 0,05$). Kadar Gula Darah Puasa pasca perlakuan pada kelompok EDGM lebih kecil dibandingkan kelompok KDM ($p < 0,05$).

Kadar TNF- α Jaringan Jantung Tikus Model Diabetes Mellitus

Efek ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap kadar TNF- α jaringan jantung tikus model Diabetes dapat dilihat pada **gambar 1**.



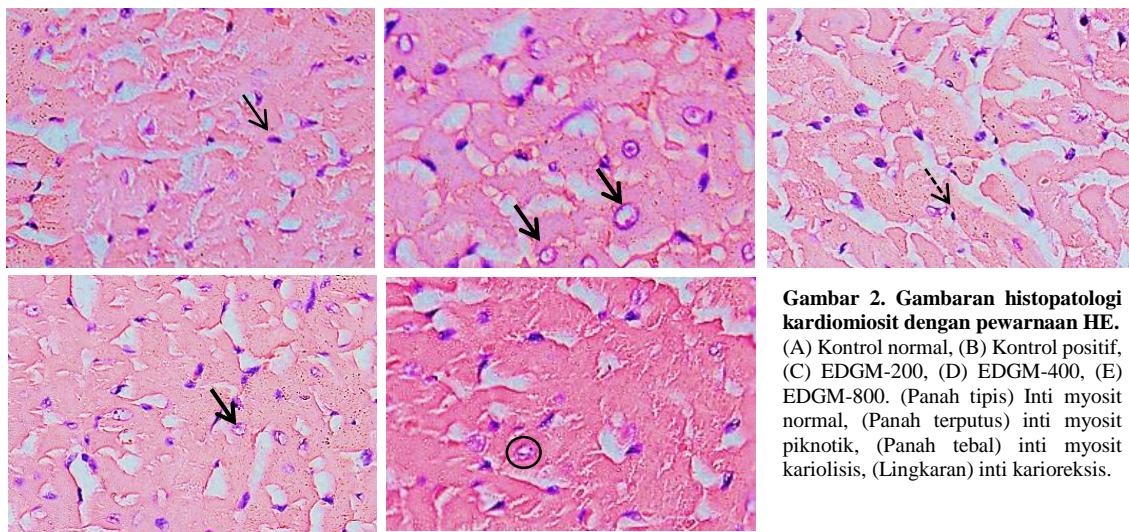
Keterangan : *a,b,c,...= huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$, LSD)

Gambar 1. Histogram kadar TNF- α jaringan jantung tikus model diabetes melitus yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah

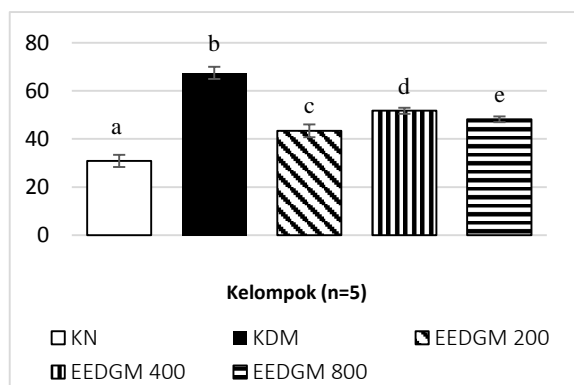
Induksi DM pada tikus dengan pemberian DTLF dan STZ meningkatkan kadar TNF- α jantung secara signifikan dengan persentase sekitar 80% dibandingkan dengan kelompok kontrol normal ($p < 0,05$). Pemberian EDGM dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB secara signifikan menurunkan kadar TNF- α jantung tikus model DM berturut-turut dengan persentase sekitar 50%, 30% dan 40% dibandingkan KDM ($p < 0,05$). Pemberian EDGM berbeda signifikan antar dosis dalam menurunkan kadar TNF- α jantung dengan efek terkuat pada dosis 200 mg/kgBB ($p < 0,05$). Pemberian EDGM dosis 200 mg/kgBB menghambat peningkatan kadar TNF- α hingga tak berbeda signifikan dengan kelompok normal ($p > 0,05$). Sedangkan kadar TNF- α jantung pada kelompok EDGM 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB lebih tinggi dibandingkan kelompok normal ($p < 0,05$)

Jumlah Nekrosis Kardiomiosit Jantung Tikus Model Diabetes Mellitus

Efek pemberian ekstrak etanol daun gedi merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) terhadap jumlah nekrosis kardiomiosit (/LP) tikus model diabetes melitus dapat dilihat pada **gambar 2** dan **gambar 3**.



Gambar 2. Gambaran histopatologi kardiomiosit dengan pewarnaan HE. (A) Kontrol normal, (B) Kontrol positif, (C) EDGM-200, (D) EDGM-400, (E) EDGM-800. (Panah tipis) Inti miyosit normal, (Panah terputus) inti miyosit piknotik, (Panah tebal) inti miyosit kariolisis, (Lingkaran) inti karioreksis.



Keterangan : *a,b,c,...= huruf berbeda menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$, LSD)

Gambar 3. Histogram jumlah nekrosis kardiomiosit tikus model diabetes melitus yang telah diberikan ekstrak etanol daun gedi merah.

Induksi DM dengan pemberian DTLF dan STZ meningkatkan secara signifikan jumlah nekrosis kardiomiosit sekitar 2 kali lipat dibandingkan kontrol normal ($p < 0,05$). Pemberian EDGM dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kg BB berbeda signifikan menurunkan jumlah nekrosis kardiomiosit dengan persentase berturut-turut 40%, 20%, dan 30% dibandingkan KDM ($p < 0,05$). Pemberian EDGM berbeda signifikan antar dosis dalam menurunkan jumlah nekrosis kardiomiosit dengan efek terkuat pada dosis 200 mg/kgBB ($p < 0,05$). Jumlah nekrosis kardiomiosit pada kelompok EDGM lebih tinggi sekitar 40%-70% dibandingkan kelompok normal ($p < 0,05$).

Korelasi Kadar TNF- α Jantung dengan Jumlah Nekrosis Kardiomiosit Tikus Model Diabetes Mellitus

Hasil uji korelasi *Pearson* antara kadar TNF- α jantung dengan jumlah nekrosis kardiomiosit dapat dilihat pada **tabel 2**.

Tabel 2. Uji Korelasi TNF- α Jantung dengan Jumlah Nekrosis Kardiomiosit

Correlations		TNF-Alpha	Nekrosis Kardiomiosit
TNF-Alpha	Pearson Correlation	1	,835**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	25	25
Nekrosis Kardiomiosit	Pearson Correlation	,835**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	25	25

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Hubungan antara TNF- α jantung dengan jumlah nekrosis kardiomiosit menunjukkan nilai signifikan ($p < 0,05$) dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,835. Nilai koefisien korelasi tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat dan searah antara kadar TNF- α jantung dengan jumlah nekrosis kardiomiosit.

PEMBAHASAN

Karakteristik Sampel

Penelitian ini menggunakan tikus galur *Sprague dawley* jantan berusia 4-6 minggu dengan berat badan 180-200 gram. Pemilihan galur *Sprague dawley* sebagai hewan uji karena memiliki temperamen yang baik sehingga cukup tahan terhadap perlakuan⁴⁶. Selain itu, tikus *Sprague dawley* memiliki karakteristik fisiologi yang mirip dengan manusia dibandingkan kelinci⁴⁷. Tikus jantan digunakan sebagai hewan uji karena tidak memiliki hormon yang berpengaruh terhadap penelitian⁴⁸. Tikus dipelihara dalam kandang *single cage* dengan tujuan agar variasi aktivitas fisik tikus tidak jauh berbeda. Pemeliharaan dengan kandang *single cage* ini juga mempermudah peneliti untuk menghitung sisa pakan tikus³³.

Berat badan kelompok Ekstrak Daun Gedi Merah (EDGM) pasca perlakuan menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan kelompok KDM. Peningkatan berat badan tersebut diduga karena adanya aktivitas senyawa flavonoid dan saponin pada ekstrak etanol daun gedi merah. Senyawa flavonoid berperan dalam peningkatan berat badan dengan cara meningkatkan sensitivitas insulin melalui penetralan radikal bebas, sedangkan saponin berperan dalam stimulasi pelepasan insulin. Peningkatan stimulasi pelepasan insulin dan sensitivitas insulin meningkatkan pemasukan glukosa ke dalam sel. Hal tersebut menyebabkan penghambatan pada lipolisis sehingga berat badan tidak menurun^{24,40}.

Sedangkan pada kelompok KDM pasca perlakuan memiliki berat badan yang lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok KN. Berat badan yang rendah pada kelompok DM disebabkan oleh induksi DTLF dan STZ yang berperan dalam

resistensi insulin dan penurunan sekresi insulin^{17,18,19}. Resistensi dan penurunan sekresi insulin menyebabkan terjadinya peningkatan lipolisis sehingga terjadi penurunan berat badan kelompok KDM⁴⁹. Pada hasil pengukuran asupan pakan didapatkan penurunan nafsu makan pada KDM dibandingkan kelompok KN. Hal tersebut diduga karena adanya absorpsi lemak yang memicu produksi *cholecystokinin* (CCK). Produksi CCK dapat memperlambat pengosongan lambung. CCK mengaktifasi *propiomelanocortin* (POMC) di hipotalamus yang menyebabkan rasa kenyang sehingga terjadi penurunan asupan pakan^{51,55}.

Kadar gula darah puasa (KGDP) pra perlakuan pada kelompok KDM memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan kelompok KN. Peningkatan KGDP diduga disebabkan karena induksi DTLF dan STZ yang menimbulkan resistensi insulin serta penurunan sekresi insulin sehingga terjadi hiperglikemia^{17,18,19}. Sedangkan KGDP pada kelompok EDGM pasca perlakuan menunjukkan penurunan dibandingkan kelompok KDM. Hal tersebut diduga disebabkan karena adanya senyawa aktif seperti flavonoid dan saponin pada daun gedi merah, yang berperan sebagai antidiabetik. Flavonoid berperan dalam peningkatan sensitivitas insulin, sedangkan saponin berperan dalam stimulasi pengeluaran insulin yang menyebabkan penurunan kadar glukosa^{24,40}.

Efek Induksi DTLF dan STZ terhadap Kadar TNF- α Jantung dan Jumlah Nekrosis Kardiomiosit Tikus Model Diabetes Mellitus

Induksi DTLF dan STZ pada kelompok KDM dapat meningkatkan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomiosit. Peningkatan tersebut terjadi karena adanya kondisi stres oksidatif akibat hiperglikemia melalui resistensi insulin yang disebabkan oleh induksi DTLF dan kerusakan sel β pankreas oleh STZ.

Diet tinggi lemak dapat meningkatkan *Free Fatty Acid* (FFA) yang berperan dalam peningkatan *diacylglycerol* (DAG) dan Protein Kinase C (PKC). Protein Kinase C merupakan enzim yang berperan dalam fosforilasi serin pada *Insulin Receptor Substrat* (IRS-1). Fosforilasi serin pada IRS-1 menyebabkan terjadinya resistensi insulin yang berlanjut pada kondisi hiperglikemia¹⁷.

Diet tinggi fruktosa memicu metabolisme fruktosa oleh hepar. Molekul fruktosa akan diserap melalui glukosa transporter 5 (GLUT5) dan dikeluarkan menuju aliran darah. Fruktosa akan masuk ke dalam hepatosit melalui GLUT2 dan diubah menjadi fruktosa 1-fosfat oleh enzim fruktokinase. Fruktosa 1-fosfat kemudian diubah menjadi triose fosfat oleh enzim aldolase B. Peningkatan triose fosfat memicu terjadinya sintesis glikogen dan asam lemak dari karbon fruktosa melalui jalur *de novo lipogenesis*. Pembentukan asam lemak yang tinggi menyebabkan penurunan sensitivitas insulin sehingga ambilan glukosa menurun. Hal tersebut memicu proses lipolisis yang menyebabkan peningkatan FFA sehingga terjadi

resistensi insulin dan berlanjut pada kondisi hiperglikemia¹⁸.

Induksi streptozotocin (STZ) menyebabkan hiperglikemia melalui kerusakan pada sel β pankreas sehingga menurunkan produksi insulin. STZ memasuki sel β melalui GLUT2 dan menyebabkan alkilasi DNA. Kerusakan pada DNA memicu aktivasi *poly ADP-ribosylation* yang menyebabkan deplesi pada NAD⁺ dan ATP seluler. Peningkatan defosforilasi ATP menimbulkan pembentukan substrat untuk *xanthine oxidase* yang memicu pembentukan radikal *superoxide*. Selain itu, STZ juga membebaskan sejumlah nitrit oksida toksik yang menghambat aktivitas aconitase dan berperan dalam kerusakan DNA. Hal tersebut menyebabkan terjadinya nekrosis pada sel β pankreas sehingga menurunkan produksi insulin³².

Kondisi hiperglikemia kronis akibat induksi DTLF dan STZ menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi kondisi stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif dapat menimbulkan kerusakan oksidatif sehingga memicu reaksi inflamasi melalui aktivasi NF- κ B yang meningkatkan sitokin proinflamasi seperti TNF- α ⁵. *Tumor Necrosis Factor- α* merupakan sitokin proinflamasi yang diekspresikan oleh aktivasi sel-sel radang seperti makrofag dan limfosit. *Tumor Necrosis Factor- α* mentransmisikan sinyal melalui TNF reseptor 1 (TNFR1) pada kardiomyosit. *Tumor Necrosis Factor- α* berikatan dengan TNFR1 menyebabkan nekrosis kardiomyosit melalui inhibisi *caspase-8* dan stabilisasi *receptor interacting protein 1* (RIP1)^{21,8}. *Death domain* (DD) pada RIP1 mengikat TNF-reseptor associated death domain (TRADD) dan Fas associated via death domain (FADD) yang menyebabkan peningkatan metabolisme melalui glikolisis dan glutaminolisis. Hal tersebut memicu fosforilasi oksidatif yang meningkatkan produksi ROS sehingga terjadi nekrosis kardiomyosit³⁶.

Induksi lemak pada DTLF juga dapat menginduksi inflamasi yang meningkatkan kadar TNF- α jantung. Peningkatan kadar *free fatty acid* dalam darah akibat induksi lemak dapat mengaktifkan makrofag yang memicu produksi sitokin pro-inflamasi TNF- α . Aktivasi makrofag dapat mencapai pembuluh darah sehingga memicu terjadinya inflamasi perifer⁵³.

Stres oksidatif yang disebabkan oleh ROS dapat menyebabkan nekrosis kardiomyosit secara langsung melalui jalur *RIP-mediated necrosis* dan jalur *mitochondrial necrosis*. Peningkatan produksi ROS pada mitokondria memicu nekrosis kardiomyosit yang menyebabkan kerusakan miokardium. ROS juga meningkatkan protein RIP1 dan RIP3 sehingga memicu nekrosis kardiomyosit yang diinduksi H₂O₂⁴³.

Pada penelitian ini didapatkan kadar TNF- α jantung kelompok KN bernilai sekitar 498 pg/mL yang menunjukkan bahwa kadar tersebut masih berada dalam rentang normal. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hadi *et al* (2013) dan Hasri *et al* (2015) yang menyebutkan bahwa

kadar rerata normal TNF- α jantung tikus berkisar sekitar 200-600 pg/mL. Pada penelitian ini, induksi STZ dan DTLF meningkatkan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomyosit sekitar dua kali lipat dibandingkan kontrol normal. Hal ini sesuai dengan teori bahwa induksi STZ dan DTLF dapat menyebabkan hiperglikemia yang memicu stres oksidatif sehingga terjadi reaksi inflamasi yang meningkatkan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomyosit pada tikus DM. Pada pembuatan tikus model DM tipe 2 pada penelitian ini tidak dievaluasi pengukuran indeks sensitivitas insulin sehingga hal tersebut merupakan bias dalam penelitian.

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah terhadap Kadar TNF- α Jaringan Jantung Tikus Model Diabetes Melitus

Pemberian ekstrak daun gedi merah (EDGM) dapat menghambat peningkatan kadar TNF- α jantung pada tikus model DM. Efek tersebut dikendalikan oleh senyawa daun gedi merah yang berpotensi sebagai antiinflamasi¹⁰. Efek antiinflamasi pada daun gedi merah yang secara langsung dapat mencegah peningkatan kadar TNF- α jantung diperantarai oleh flavonoid. Flavonoid dapat menghambat pelepasan mediator inflamasi dan metabolisme asam arakidonat melalui inhibisi enzim siklooksigenase-2 (COX-2) dan 5-lipooksigenase (5-LOX)²⁷. Penghambatan enzim 5-LOX akan mengurangi produksi beberapa sitokin inflamasi salah satunya TNF- α ³⁸. Selain itu, flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α melalui inhibisi NF- κ B^{27,34}. Quercetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang memiliki aktivitas antiinflamasi dengan memodulasi produksi dari sitokin proinflamasi TNF- α ²⁸. Pada penelitian yang dilakukan oleh Suoth *et al* (2013) menunjukkan bahwa daun gedi merah mengandung flavonoid golongan flavanon. Naringenin dan hesperetin merupakan senyawa aktif jenis flavanon yang memiliki efek antiinflamasi. Naringenin dan hesperetin secara langsung berperan dalam menghambat peningkatan sitokin pro-inflamasi TNF- α yang diinduksi oleh FFA⁵⁶.

Efek antioksidan pada daun gedi merah secara tidak langsung juga berperan dalam menghambat peningkatan kadar TNF- α jantung. Efek antioksidan pada EDGM diperantarai oleh senyawa flavonoid dan alkaloid. Senyawa flavonoid dapat mencegah *injury* yang disebabkan oleh radikal bebas. Flavonoid menghambat stres oksidatif melalui reaksi dengan radikal bebas sehingga menghasilkan radikal yang lebih stabil. Gugus hidroksil dari flavonoid memiliki reaktivitas yang tinggi sehingga dapat menginaktivasi radikal²⁵. Sementara senyawa alkaloid memiliki potensi sebagai antioksidan primer dengan cara mendonorkan atom H pada radikal bebas²⁶. Aktivitas antioksidan pada daun gedi merah dapat menghambat kondisi stres oksidatif sehingga reaksi inflamasi terhambat yang

menyebabkan penurunan sitokin proinflamasi TNF- α .

Aktivitas antidiabetik pada daun gedi merah juga berperan secara tidak langsung dalam menghambat peningkatan kadar TNF- α jantung yang diperantarai oleh kandungan senyawa berupa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin¹³. Flavonoid dalam daun gedi merah berperan dalam mencegah rusaknya sel β pankreas serta menetralkan radikal bebas yang dapat meningkatkan sensitifitas insulin⁴⁰. Flavonoid juga berperan dalam menghambat enzim α glukosidase sehingga dapat menurunkan glukosa darah¹¹. Senyawa alkaloid sebagai antidiabetik berperan dalam menghambat absorpsi glukosa di usus, meningkatkan transportasi glukosa dalam darah serta memicu sintesis glikogen²². Senyawa saponin dalam daun gedi merah juga memiliki aktivitas antidiabetes melalui inhibisi enzim α glukosidase pada usus yang berperan untuk menurunkan kadar glukosa darah dengan menghambat perubahan disakarida menjadi glukosa²³. Selain itu, senyawa saponin juga memiliki aktivitas menstimulasi pelepasan insulin²⁴. Sedangkan senyawa tanin pada daun gedi merah berperan dalam pengerutan membran epitel usus yang mengurangi penyerapan glukosa sehingga kadar glukosa darah berkurang¹². Efek antidiabetik pada daun gedi merah dapat menghambat peningkatan glukosa darah sehingga menghambat kondisi stres oksidatif dan reaksi inflamasi yang menyebabkan penurunan sitokin proinflamasi TNF- α .

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan signifikan antar dosis EDGM dalam menghambat peningkatan TNF- α dengan efek terkuat pada dosis I. Hal ini diduga karena adanya kandungan flavonoid yang berlebihan pada EDGM dosis II dan III yang dapat bertindak sebagai pro-oksidan sehingga memicu peningkatan radikal bebas serta peningkatan kadar TNF- α jantung³⁵. Pada penelitian ini didapatkan kesan *non-dependent dose* karena tidak adanya peningkatan efek yang menyertai peningkatan dosis. Hal ini diduga karena terdapat senyawa multikomponen pada daun gedi merah yang memiliki berbagai mekanisme kerja sehingga peningkatan dosis tidak diiringi peningkatan efek.

Hasil penelitian ini dapat terjadi diduga karena asupan pakan yang rendah pada kelompok EDGM dosis I. Induksi lemak pada DTLF dapat menginduksi inflamasi yang meningkatkan kadar TNF- α jantung. Peningkatan kadar *free fatty acid* dalam darah akibat induksi lemak dapat mengaktifasi makrofag yang memicu produksi sitokin pro-inflamasi TNF- α . Aktivasi makrofag dapat mencapai pembuluh darah sehingga memicu terjadinya inflamasi perifer⁵³.

Tumor Necrosis Factor- α merupakan sitokin yang berperan dalam proses inflamasi, imunitas dan apoptosis. *Tumor Necrosis Factor- α* diekspresikan oleh aktivasi sel-sel radang seperti makrofag dan limfosit. *Tumor Necrosis Factor- α* mentransmisikan sinyal melalui dua reseptor, yaitu TNF reseptor 1 (TNFR1) dan TNF reseptor 2 (TNFR2). TNF reseptor 1 berperan hampir pada seluruh tipe sel,

sedangkan ekspresi TNFR2 terdapat pada sel endotel dan hematopoiesis^{41,42}.

Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah Terhadap Jumlah Nekrosis Kardiomyosit Tikus Model Diabetes Melitus.

Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit pada tikus DM. Hal tersebut disebabkan karena adanya senyawa pada daun gedi merah yang memiliki aktivitas antiinflamasi²⁹. Efek antiinflamasi daun gedi merah merupakan efek secara langsung terhadap penurunan jumlah nekrosis kardiomyosit melalui senyawa flavonoid. Flavonoid mampu mengurangi ekspresi berbagai sitokin proinflamasi termasuk TNF- α ³⁰. Pengurangan ekspresi gene TNF- α diperankan oleh salah satu jenis flavonoid yaitu quercetin melalui penekanan aktivitas NF- κ B²⁸. Peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit dapat dihambat melalui penurunan TNF- α sehingga tidak berikatan dengan TNFR1 yang menghambat nekrosis pada kardiomyosit. Penghambatan ekspresi sitokin dan molekul adhesi memberikan kemungkinan bahwa flavonoid memiliki mekanisme yang menyediakan efek kardio-protektif pada manusia³¹. Senyawa flavonoid golongan flavonon berupa hesperetin dan naringenin berperan dalam menghambat peningkatan TNF- α jantung sehingga dapat menurunkan jumlah nekrosis kardiomyosit⁵⁶.

Sedangkan efek antioksidan pada daun gedi merah secara tidak langsung juga berperan dalam menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit. Efek antioksidan pada daun gedi merah diperankan oleh senyawa flavonoid dan alkaloid dengan menetralkan radikal bebas melalui oksidasi oleh radikal tersebut sebagaimana yang telah dijelaskan sebelumnya²⁵. Penetralkan radikal bebas akan mengurangi reaksi inflamasi yang dapat mencegah peningkatan sitokin proinflamasi TNF- α sehingga mencegah peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit. Flavonoid juga dapat mengurangi pembentukan ROS pada mitokondria sehingga dapat mencegah peningkatan nekrosis kardiomyosit^{43,44}.

Daun gedi merah juga memiliki aktivitas antidiabetik yang merupakan mekanisme secara tidak langsung dalam menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit. Efek antidiabetik daun gedi merah diperantarai oleh senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin dengan mekanisme yang sudah dijelaskan sebelumnya¹³. Penghambatan hiperglikemia oleh senyawa-senyawa tersebut dapat mencegah stres oksidatif dan kerusakan oksidatif sehingga dapat mencegah peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit yang disebabkan oleh peningkatan ROS dan TNF- α .

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan signifikan antar dosis EDGM dalam menghambat peningkatan jumlah nekrosis kardiomyosit tikus model DM. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Khalidiyah (2020) menunjukkan bahwa EDGM dengan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kgBB dapat menghambat peningkatan

MDA jantung secara signifikan. Penurunan MDA jantung menunjukkan terjadinya penurunan radikal bebas yang menyebabkan penurunan jumlah nekrosis kardiomyosit⁵⁰. Namun pada penelitian ini didapatkan kesan *non-dependent dose* sehingga peningkatan dosis tidak disertai dengan peningkatan efek. Hal tersebut diduga disebabkan karena adanya kandungan multikomponen dengan berbagai mekanisme pada daun gedi merah sehingga tidak terjadi peningkatan efek yang mengiringi peningkatan dosis. Kekurangan pada penelitian ini adalah tidak dilakukan skrining senyawa fitokimia pada ekstrak etanol daun gedi merah sehingga tidak dapat diketahui senyawa aktif yang berefek terhadap variabel penelitian. Ekstrak etanol daun gedi merah juga tidak dilakukan uji senyawa tunggal sehingga tidak dapat diketahui mekanisme kerja dari senyawa aktif EDGM.

Kerusakan berupa nekrosis pada kardiomyosit disebabkan oleh aktivitas sitokin proinflamasi yaitu TNF- α . Nekrosis kardiomyosit ditandai dengan adanya perubahan inti berupa piknosis, karioreksis dan kariolisis. Piknosis berupa inti yang mengecil dengan peningkatan warna basofil. Gambaran karioreksis berupa inti piknotik yang mengalami fragmentasi, sedangkan pada gambaran kariolisis warna basofil dan kromatin akan memudar³⁷.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dan pembahasan di atas :

1. Induksi DTLF dan STZ meningkatkan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomyosit
2. Pemberian ekstrak etanol daun gedi merah dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB secara signifikan menghambat peningkatan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomyosit.
3. Dosis 200 mg/kgBB merupakan dosis dengan efek paling kuat dalam menghambat peningkatan kadar TNF- α jantung dan jumlah nekrosis kardiomyosit.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan bahwa :

1. Melakukan penelitian mengenai mekanisme kerja senyawa-senyawa aktif pada daun gedi merah secara *in silico*
2. Melakukan penelitian mengenai indeks resistensi insulin
3. Melakukan penelitian dengan dosis yang lebih rendah dari 800 mg/kgBB dan waktu yang berbeda

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah membantu pendanaan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jia G, Michael A, & J G Sowers. Diabetic Cardiomyopathy: an update of mechanism contributing to this clinical entity. *Circulation Research*. 2018. 122:624-638
2. Lorenzo-Almoroz, A., et al. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*. 2017. 16.1: 1-14
3. Giacco, F & M, Brownlee. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 2010. 107(9): 1058-1070
4. Ahmed R G, A F Azmy, S Incerpi & A Gaber. The Developmental and Physiological Interaction between Free Radical and Antioxidant Defense System: Effect of Environmental Pollutants. *Journal of Natural Science Research*. 2013. 3(13):74-110
5. Nunes, S., Soares, E., Periera, F & Reis, F. The Role of Inflammation in Diabetic Cardiomyopathy. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*. 2012. 4:59-73
6. Supit, I. A., D, H, C. Pengemaman & Sylvia R M. Profil Tumor Necrosis Factor (TNF- α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (IMT) pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNSRAT Angkatan 2014. *Journal e-Biomedik*. 2015. 3(2):640-643
7. Zhang, et al. Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clin Sci*. 2009. 116(3):219-230
8. Chu WM. Tumor Necrosis Factor. *Cancer Lett*. 2013. 328(2):222-225
9. Chiong, M., Wang, ZV., Pedrozo, Z., et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis*. 2011. 2(12):e224
10. Nurjannah. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L) Terhadap Penurunan Tekanan Darah Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Prednison dan Garam. [Skripsi]. 2016. Universitas Islam Negeri Alauddin, Makassar.
11. Dewantara I K G, I Wayan G G & I N Wirajana. Uji Potensi Ekstrak Etanol Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L.) Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Galur Wistar yang Diinduksi Aloksan. *Cakra Kimia*. 2017.5(2):94-101
12. Tandi, J., Muthi'ah, H Z., Yuliet & Yusriadi. Efektivitas Daun Gedi Merah Terhadap Glukosa Darah, Malondialdehid, 8-Hidroksi-Deoksiganosin, Insulin Tikus Diabetes. *J. Trop. Pharm. Chem*. 2016. 3(4):264-276
13. Mercedes, Agustina. Aktivitas Antidiabetes Kombinasi Ekstrak Daun Gedi Merah dan Daun Semak Bunga Putih Tikus Induksi Streptozotocin. *Jurnal Farmasi*. 2017. 14(2):159-166
14. Murwani, S., Ali, M., Muliarta, K. Diet atherogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) sebagai model hewan

- aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2013 Apr 18;22(1):6-9.
15. Mansor, L.S., Gonzalez, E.R., Cole, M.A. *et al*. Cardiac metabolism in new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin. *Cardiovasc Diabetol*. 2013. 12, 136
 16. Firdaus, F., Rimbawan, R., Marliyati, S. A., & Roosita, K. 2016. Model Tikus Diabetes yang Diinduksi Streptozotocin-Sukrosa untuk Pendekatan Penelitian Diabetes Mellitus Gestasional. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 12(1), 29-34.
 17. Boden, G & M, Laakso. 2004. Lipids and Glucose in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004. 27(9): 2253-2259
 18. Wulansari, D. D., & Wulandari, D. D. Pengembangan Model Hewan Coba Tikus Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Induksi Diet Tinggi Fruktosa Intragastrik. *Media Pharmaceutica Indonesiana (MPI)*. 2018. 2(1), 41-47
 19. Graham, M. L., Janecek, J. L., Kittredge, J. A., Hering, B. J., & Schuurman, H. J. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comparative medicine*. 2011. 61(4), 356–360.
 20. Deeds, M. C., Anderson, J. M., Armstrong, A. S., Gastineau, D. A., Hiddinga, H. J., Jahangir, A., Eberhardt, N. L., & Kudva, Y. C. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory animals*. 2011. 45(3), 131–140.
 21. Morgan, M. J., Kim, Y. S., & Liu, Z. G. 2008. TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell research*, 18(3), 343-349.
 22. Arjadi, F., & Susatyo, P. Regenerasi sel pulau langerhans pada tikus putih (*rattus norvegicus*) diabetes yang diberi rebusan daging mahkota (*phaleria macrocarpa lam*). *Sains Medika*. 2010. 2(2), 117-126.
 23. Fiana, N., & Oktaria, D. Pengaruh kandungan saponin dalam daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap penurunan kadar glukosa darah. *Jurnal Majority*. 2016. 5(4), 128-132.
 24. Firdaus, M. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Gedi merah (*Abelmoschus manihot* L. Medik) terhadap Radikal Bebas DPPH dan Aktivitas Enzim Glutation Peroksidase pada Tikus Diabetes. 2018. Doctoral dissertation, Universitas Setia Budi Surakarta.
 25. Panche, A., Diwan, A. D., Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 2016, 5.
 26. Kurniati, Ruth Indah, et al. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Daun Buas-Buas (*Premna cordifolia* Linn.) dengan Metode DPPH. 2013. PhD Thesis. Tanjungpura University.
 27. Farzei, et al. Targeting Inflammation by Flavonoids: Novel Therapeutic Strategy for Metabolic Disorder. *Int. J. Mol*. 2019. 20, 4957
 28. Nair, Madhavan P., et al. The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- κ B system. *Clinical and vaccine immunology*, 2006, 13.3: 319-328.
 29. Wulan, O. T., & Indradi, R. B. Profil Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi Gedi (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik.). *Farmaka*, 2018. 16(2).
 30. Serafini, Mauro; Peluso, Ilaria; Raguzzini, Anna. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2010, 69.3: 273-278.
 31. Rathee, Permender, et al. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & allergy-drug targets (formerly current drug targets-inflammation & allergy)*, 2009, 8.3: 229-235.
 32. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-546.
 33. Sari, Risqy Amalia. Pengaruh Frekuensi Stres Fisik (Forced Swimming) Terhadap Kadar Leptin Serum Tikus Betina. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*, 2019, 6.1.
 34. Izzi, Valerio, et al. The effects of dietary flavonoids on the regulations on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2012, 17.7:2396-2418.
 35. Skibola, Christine, F & Martyn, T Smith. Potential Health Impact of Excessive Flavonoid Intake. Elsevier. 2000; 29: 375-383.
 36. Kung G, Konstantinidis K, Kitsis RN. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart. *Circulation research*. 2011 Apr 15;108(8):1017-1036.
 37. Kumar, Vinay; Abbas, A. K.; Aster, J. C. Robbins basic pathology. 9th. Philadelphia, USA, Saunders: Elsevier, 2013, 2572013.
 38. Pihlaja, Rea; Haaparanta-Solin, Merja; Rinne, Juha O. The anti-inflammatory effects of lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors in inflammation-induced human fetal glia cells and the A β degradation capacity of human fetal astrocytes in an ex vivo assay. *Frontiers in neuroscience*, 2017, 11: 299.
 39. Alverina, Cindy; Andari, Desi; Prihanti, Gita Sekar. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Terhadap Sel Kardiomyosit Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar) dengan Diet Aterogenik. *Saintika Medika: Jurnal Ilmu Kesehatan dan Kedokteran Keluarga*, 2016, 12,1: 30-37.
 40. Ajie, Rizky Bayu. White dragon fruit (*Hylocerus undatus*) Potential as Diabetes Mellitus Treatment. *Jurnal Majority*, 2015, 4.1.
 41. Sakimoto, T., Yamada, A., & Sawa, M. Release of soluble tumor necrosis factor receptor 1 from corneal epithelium by TNF- α -converting

- enzyme-dependent ectodomain shedding. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2009, 50(10), 4618-4621.
42. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, 2010, 49(7), 1215-1228.
 43. Xu, Tao, et al. Oxidative stress in cell death and cardiovascular diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 2019.
 44. Kicinska, Anna; Jarmuszkiewicz, Wiesława. Flavonoids and Mitochondria: Activation of Cytoprotective Pathways?. *Molecules*, 2020, 25.13: 3060.
 45. Elabscience. Rat TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) ELISA Kit. Elabscience Biotechnology Co Ltd, 2019, p;1-11
 46. Pambudi, Ridho, et al. Perbedaan Panjang Serta Berat Tubuh Fetus Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Galur Sprague-Dawley Terhadap Pemberian Asam Folat Pada Periode Kehamilan Yang Berbeda. 2017.
 47. Nugraheni, Kartika Pengaruh Pemberian Minyak Zaitun Ekstra Virgin Terhadap Profil Lipid Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Strain Sprague Dawley Hiperkolesterolemia. 2012. PhD Thesis. Diponegoro University.
 48. Tambunan, S., Malik, Z., & Ismawati, I. 2015. Histopatologi aorta torasika tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan setelah pemberian diet aterogenik selama 12 minggu. 2015. Doctoral dissertation, Riau University.
 49. Phielix, Esther; Roden, Michael. Assessing multiple features of mitochondrial function. *Diabetes*, 2013, 62.6: 1826-1828.
 50. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*. 2004;57(9-10):453-455
 51. Nesti, Dela Ria. Morfologi Morfometri dan Distribusi Sel Imunoreaktif Insulin dan Glukagon Pada Pankreas Tikus Obesitas. 2015. Master Thesis, Universitas Gajah Mada
 52. Prasetyo, Bayu Bagus. Penambahan CMC (Carboxy Methyl Cellulose) pada Pembuatan Minuman Madu Sari Buah Jambu Merah (*Psidium guajava*) ditinjau dari pH, viskositas Total Kapang dan Mutu Organoleptik. 2014. PhD Thesis. Universitas Brawijaya.
 53. Duan, Yehui, et al. Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 2649.
 54. Hadi, N. R., Al-amran, F., Yousif, M., and Zamil, S. T. Antiapoptotic effect of simvastatin ameliorates myocardial ischaemia/reperfusion injury. *International Scholarly Research Notices*. 2013
 55. Hana, Amelia; Airin, Claude Mona. Gambaran Fisiologis Kadar Kolesistokinin Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Jantan Umur 1 Bulan. *Buletin Anatomi dan Fisiologi (Bulletin of Anatomy and Physiology)*, 2018, 3.2: 140-145.
 56. Yoshida, H., Takamura, N., Shuto, T., Ogata, K., Tokunaga, J., Kawai, K., and Kai, H. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- α in mouse adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010, 394(3), 728-732.
 57. Suoth, E., Kaempe, H., and Tampi, A. Evaluasi Kandungan Total Polifenol dan Isolasi Senyawa Flavonoid Pada Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L. *Chemistry Progress*, 2013, 6(2)
 58. Hasri, R., Elyani, H., & Yahya, A. The Effect of Nipah (*Nypa fructicans* Wurm.) Leaf Decocta On The Cardiac Tissue TNF- α in Diabetes Mellitus Typer 2 Rats. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*, 2015, 2(2)
 59. Khalidiyah, S., Hidayah, F. K., and Purnomo, Y. 2020. Efek Ekstrak Etanol Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) Terhadap Kadar SOD dan MDA Jantung Tikus Model Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal Kedokteran Komunitas*, 8(2).